

# **Az akut húgyhólyaghurut molekuláris háttere és gyógyításának lehetséges új célpontjai**

Ph.D. Tézis  
/rövidített változat /

Dr. Nagy Károly

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola,  
Általános Orvostudományi Kar, Szegedi Tudományegyetem

Témavezető: Prof. Tenke Péter Ph.D., MTA doktora

*Jahn Ferenc Dél-pesti Kórház és Rendelőintézet, Urológiai Osztály, Budapest  
Mikrobiológiai, Immunológiai és Glikobiológiai Intézet, Lundi Egyetem, Lund, Svédország*

Szeged  
2020

# 1 BEVEZETÉS

A fertőző betegségek csoportján belül a húgyúti infekciók jelentősége kiemelkedő, mind a fertőzések számát, mind az antibiotikum-felhasználást nézve. Általánosságban, a nők 40-50%-a, a férfiak közel 20%-a találkozik a húgyúti fertőzés valamely formájával az élete során. Az elmúlt évtizedek nagyarányú antibiotikum felhasználásának köszönhetően a kórokozók antibiotikummal szembeni rezisztenciája folyamatosan növekszik, ezzel nehezítve meg a betegek kezelését. A megfelelő antibiotikum politika és újabb antibiotikumok kifejlesztése mellett kiemelkedően fontos a fertőző betegségek háttérében végbemenő molekuláris folyamatok, genetikai faktorok megismerése, melyek segítségével csökkenthető a fertőzések kialakulásának esélye és a felesleges antibiotikum-felhasználás.

A húgyúti fertőzések megjelenése és súlyossága széles skálán mozog, az egyszerű hólyaghuruttól a súlyos, életet veszélyeztető uroszepszisig. Akut pyelonephritis során a baktériumok elérik a vesemedencét és súlyos gyulladást eredményeznek, mely a veseparenchymába progrediál, magas lázat, elesettséget és erős vesetáji panaszokat okozva. Akut hólyaghurut esetén a fertőzés a húgyhólyagra lokalizálódik, és a gyulladás során intenzív és gyors immunválaszt vált ki lokálisan. A betegség tünetei a gyakori és fájdalmas vizelés, alhasi fájdalom, láz nélkül. Amíg a két betegség klinikai képe és definíciója jól meghatározott, addig a molekuláris szinten zajló különbségek nem teljesen ismertek. A baktériumok és a hólyagnyálkahártya interakciója során létrejövő gyulladásos kaszkád számos sejttípus aktivációját eredményezi, mint pl. hízósejtek, makrofágok, azonban a húgyhólyagban jelenlévő idegsejtek aktiválódásának pontos módja és mértéke nem tisztázott, holott a betegek számára az akut hólyaghurut során jelentkező erős fájdalom a legmeghatározóbb panasz.

# 2 CÉLKITŰZÉSEK

A vizsgálat fő célja az akut cystitis (CY) esetén végbemenő molekuláris folyamatok, genetikai faktorok feltárása és az ezeken alapuló lehetséges új terápiás lehetőségek felmérése.

1. IL-1 $\beta$  válasz értékelése akut cystitis során, in vitro. (I. Közlemény)
2. Az inflammaszóma funkciójának, az IL-1 $\beta$  érésének és az inflammaszóma alkotóelemeinek (ASC, NLRP-3) vizsgálata állatmodellben, in vivo. (I. Közlemény)

3. Hólyagfertőzést okozó baktériumtörzsek által kiváltott neuropeptid- és neuropeptid receptor (SP/NK1R) válasz vizsgálata (in vivo és in vitro), valamint a hólyagnyálkahártya és idegsejt interakciók feltérképezése akut cystitis során, in vivo. (II. Közlemény)
4. Az IL-1 receptor, IL-1 $\beta$  feldolgozás és a NK1R gátlás vizsgálata akut cystitis során, in vivo. (I.-II. Közlemény)
5. Az IL-1 $\beta$  és a neuropeptidek humán relevanciája. (I.-II. Közlemény)

### 3 MÓDSZEREK

#### 3.1 Az IL-1 $\beta$ válasz akut cystitis során, *in vitro*

Az IL-1 $\beta$  válasz felmérésére, betegekből izolált akut cystitist (CY) vagy tünetmentes bakteriuriát (ABU) okozó *E. coli* törzsekkel humán húgyhólyag- (HTB-9) és vese epithelsejteket (A-498) fertőztünk meg. A fertőzéshez használt CY és ABU törzsek izolálása egy korábbi prospektív vizsgálat során történt, azonos epidemiológiai és geográfiai csoportból. A kísérletek során referenciaként a jól karakterizált uropatogén *E. coli* CFT073 és a tünetmentes bakteriuriát okozó *E. coli* 83972 (ABU) törzseket használtuk. Annak vizsgálatára, hogy az akut cystitist okozó baktériumtörzseket mennyire jellemzi az IL-1 $\beta$  válasz kiváltásának képessége, az epithelsejtek megfertőzését követően ( $10^8$  CFU/ml + gentamicin, 4 óra) az IL-1 $\beta$  szintek mérését végeztük a sejtfelülűszókban. Ezenfelül a fertőzött epithelsejtek sejtfelülűszóinak és lizátumainak immuncitokémiai, ELISA és Western blot vizsgálatát is elvégeztük az IL-1 $\beta$  termelődésének, érésének és szekréciójának pontosabb vizsgálatára. Ezen kísérleteknél az epithelsejtek megfertőzése  $10^4$  vagy  $10^5$  CFU/ml koncentrációban, 1 vagy 4 órán át történt.

#### 3.2 Az inflammaszóma funkciójának, az IL-1 $\beta$ érésének, és az inflammaszóma alkotóelemeinek (ASC, NLRP-3) vizsgálata, *in vivo*

Annak eldöntésére, hogy az akut cystitis patogenezisében milyen szerepet játszanak az *Il1b* génnek és az inflammaszóma aktivációja, *E. coli* baktériummal megfertőzött C57BL/6 egerek (intakt inflammaszóma funkcióval) összehasonlítása történt szintén fertőzött IL-1 $\beta$  (*Il1b*<sup>-/-</sup>), NLRP-3 (*Nlrp3*<sup>-/-</sup>), és ASC (*Asc*<sup>-/-</sup>) génmódosított egerekkel. Az egereket Izofluránnal történő elaltatást követően a hólyagba vezetett vékony polietilén katéteren keresztül fertőztük meg

( $10^8$  CFU /0.1 ml). A kísérletes infekcióhoz a CY-17 és CY-92, magas IL-1 $\beta$  választ kiváltó, *E. coli* törzsek voltak kiválasztva, valamint a kontrollnak használt baktériumtörzsek (CFT073, ABU-83972). A kísérlet során meghatározott időközönként (6, 24 óra, illetve 3 és 7 nap) értékeltük az egerektől gyűjtött vizeletmintákat (vizeletüledék és vizelettenyésztés). A vizelet IL-1 $\beta$  szintjének értékelése ELISA vagy Western blot vizsgálattal történt. Az állatok boncolását követően a vesék és a húgyhólyagok fixálásra kerültek további immunhisztokémiai vizsgálatokhoz, RNS izoláláshoz. Az egyedek fertőzés okozta gyulladásának jellemzése a hólyagok makroszkópos patológiájának és mikroszkópos hisztológiájának értékelésével történt, amely során a „0” a nem megfertőzött (kontroll) állatok változást nem mutató hólyagképét jelentette, a „10”-es pedig a legnagyobb fokú észlelt gyulladást (ödéma, vörhenyesség, szöveti destrukció) mutatta.

A húgyhólyag gyulladása során kialakuló patológia hátterében végbemenő molekuláris folyamatok pontosabb megértése céljából a fertőzött hólyagokból RNS izolálását és annak genomszintű transzkripció elemzését végeztük. A fertőzés által módosított gének azonosítása a kontroll (nem-fertőzött) egyedekhez képest került meghatározásra (minden genetikai háttér esetén), (Fold Change (FC) > 1.41, és P < 0.05). Ezt követően a legmagasabb patológiai pontszámmal rendelkező *Asc*<sup>-/-</sup> és *Nlrp3*<sup>-/-</sup> egyedekben észlelt változásokat hasonlítottuk össze a legalacsonyabb patológiai pontszámmal rendelkező C57BL/6 WT és *Il1b*<sup>-/-</sup> egyedekkel.

### **3.3 A neuropeptid- és neuropeptid receptor (SP/NK1R) aktiváció a hólyagfertőzés során, *in vitro* és *in vivo***

Annak vizsgálatára, hogy az akut cystitist okozó baktériumtörzsek aktiválják-e a neuropeptid- és neuropeptid receptor választ a húgyhólyag nyálkahártyájában, idegsejteket (SH-SY5Y) és hólyaghámsejteket (HTB-9) fertőztünk meg az akut cystitist okozó *E. coli* törzsszel (CY-17) és a már korábban is használt két referencia törzsszel (CFT073 és *E. coli* 83972). Az *in vitro* fertőzés a korábban leírtak szerint történt (lásd. 3.1). A jól ismert neurokinin-1 receptor (NK1R) és Substance P (SP) expressziójának meghatározása történt. Az *E. coli* fertőzésre adott neuroepithelialis válasz *in vitro* értékelésére a sejtek immuncitokémiai vizsgálata, a felülűszók és sejtízátumok elemzése történt (ELISA, Western blot, qRT-PCR).

A neuroepithelialis aktiváció *in vivo* értékelése céljából C57BL/6WT egerek infekciója történt CY-17-tel (lásd 3.2). A hólyagfertőzés értékelését 24 óránál és 7 napnál végeztük a fertőzést

követően. Az akut cystitis súlyosságát a patológiai pontszámmal jellemeztük. A neuropeptidek expressziójának értékelésére immunhisztokémiai vizsgálatok és a húgyhólyag RNS kivonatának qRT-PCR elemzése történtek (Tacrl és a Ppt-A primerek). A kísérlet során meghatározott időközönként (6, 24 óra, illetve 3 és 7 nap) az egerektől gyűjtött vizeletminták kiértékelése is megtörtént (vizeletüledék és vizelettenyésztés). A fertőzés okozta tünetek értékelésére meghatározott időközönként videodokumentáció készült, majd ez alapján az állatok viselkedésének kielemezése (tisztálkodás, mozgás aktivitás).

### **3.4 Az IL-1 receptor, IL-1 $\beta$ feldolgozás és a NK1R gátlás vizsgálata akut cystitis során, *in vivo***

Az IL-1R vagy az NK1R gátlás *in vivo* hatásának vizsgálatára a fertőzött *Asc*<sup>-/-</sup> vagy *Nlrp3*<sup>-/-</sup> egereket (súlyos patológiát mutató egyedek) IL-1 receptor antagonistával (Anakinra, IL-1RA) vagy a NK1R antagonistával (SR140333) kezeltük. Az IL-1RA alkalmazása intraperitoneálisan (i.p.) történt, 30 perccel a fertőzést megelőzően, ezután pedig naponta egy alkalommal, 7 napon át (1 mg 100  $\mu$ l PBS-ben egér/nap). Az SR140333-at szintén intraperitoneálisan, egy órával a fertőzés előtt vagy 30 perccel fertőzés után alkalmaztuk, ebben a kísérletben az egerek 24 óra elteltével kerültek boncolásra. Az akut cystitis súlyossága a hólyagok makroszkópos értékelésével és a szöveti vizsgálat patológiai pontszámával volt jellemezve.

### **3.5 Az IL-1 $\beta$ és a neuropeptidek humán relevanciája**

A fentiek humán vonatkozásának megítélése céljából akut cystitises betegek vizeletében határoztuk meg az IL-1 $\beta$ , MMP-7 és SP koncentrációkat, és hasonlítottuk össze tünetmentes bakteriuriás betegek vizeletében mért szintekkel. A koncentrációk mérése minden esetben ELISA-val történt. Az akut cystitisben szenvedő betegek középsugár vizeletének gyűjtése Lund városának két járóbeteg ellátást nyújtó egészségügyi intézményében történt. A kontroll ABU vizeletminták olyan ABU-s betegektől származtak, akik egy korábbi prospektív placebo-kontrollált vizsgálatban vettek részt.

## 4 EREDMÉNYEK

### 4.1 Az IL-1 $\beta$ válasz akut cystitis során, *in vitro*

#### 4.1.1 Az akut cystitist okozó baktériumtörzsek által kiváltott IL-1 $\beta$ válasz

Az akut cystitist okozó baktériumtörzsekkel történt fertőzést követően (CY-17, CY-92, CY-132) a hólyag epithelsejtek gyors IL-1 $\beta$  szekrécióval válaszoltak ( $P < 0.001$ , a nem fertőzött kontroll sejtekhez képest). A CFT073 esetén ugyancsak magas IL-1  $\beta$  koncentráció volt észlelhető, ezzel szemben az ABU fertőzés nem okozott magas IL-1 $\beta$  választ ( $P < 0.001$ ). A vese epithelsejtek esetén nem volt mérhető IL-1 $\beta$  termelődés.

#### 4.1.2 Az IL-1 $\beta$ indukciója és érése

A fertőzésre adott IL-1 $\beta$ -válasz pontosabb feltérképezése érdekében a sejtfelülűsók Western blot vizsgálatát is elvégeztük pro-IL-1 $\beta$  és érett IL-1 $\beta$  specifikus antitestek használatával. A pro-IL-1 $\beta$  és az érett IL-1 $\beta$  növekedése volt észlelhető felülűsókban, ami arra utal, hogy az akut cystitis törzsek fokozzák a de novo pro-IL-1 $\beta$  szintézist és aktiválják a pro forma hasítását. Az immuncitokémiai vizsgálatok során az IL-1 $\beta$  intenzitásának gyors növekedése volt észlelhető a sejtekben. A teljes sejt lizátumok Western blot elemzése megerősítette a megnövekedett celluláris IL-1 $\beta$  szinteket.

#### 4.1.3 Az IL-1 $\beta$ epidemiológiai kapcsolata az akut cystitissel

Az akut cystitis törzsek többsége (85%) IL-1 $\beta$  választ váltott ki ( $>5$  pg/ml) (5–1 000 pg/ml). Annak értékelésére, hogy az IL-1 $\beta$  válasz cystitisre specifikus, hólyag epithelsejteket (HTB-9) a cystitis törzsekkel azonos epidemiológiai csoportból származó ABU törzsekkel fertőztünk meg ( $n = 62$ ). Az ABU törzseknek csak 15%-a váltott ki magas IL-1 $\beta$  választ  $> 10$  ug/ml. Az átlagos IL-1 $\beta$  válasz 121,8 pg / ml volt az akut cystitis törzseknél, míg az ABU törzsek esetében ez 32,4 pg / ml ( $P < 0,001$ ).

### 4.2 Az inflammaszóma funkciójának, az IL-1 $\beta$ érésének és az inflammaszóma alkotóelemeinek (ASC, NLRP-3) vizsgálata, *in vivo*

#### 4.2.1 Az akut cystitis *Il1b* és inflammaszóma gének általi kontrollja

A fertőzést követő 7. napon jelentős különbségek alakultak ki a patológiában különböző genotípusú egerekben. Az *Nlrp3*<sup>-/-</sup> és *Asc*<sup>-/-</sup> egerek hólyagja súlyos gyulladást mutatott, kiterjedt

szöveti destrukcióval. Az átlagos makroszkópos patológiai pontszám 7.9 volt az *Asc*<sup>-/-</sup> esetén és 7.2 a *Nlrp3*<sup>-/-</sup> esetén. A vizeletüledékben és a hólyagszövetekben is magas baktérium- és neutrofilszám volt észlelhető. Ezzel szemben a C57BL/6 egerekben, a húgyhólyag epithéliuma egyértelműen megtartott volt, kevés kerek sejt infiltrációval (átlagos patológiai pontszám 1.5). Az immunhisztokémiai vizsgálatok során kevés baktérium és neutrofil volt detektálható. Az *Il1b*<sup>-/-</sup> egerek hólyagjában nem volt elváltozás sem a makroszkópos morfológiában, sem a szöveti patológiában. Figyelemre méltó, hogy a szövettani vizsgálat során a hólyagfalban nem voltak baktériumok és neutrofilek sem, ezzel összhangban az egerek vizeletében alacsony baktérium- és neutrofilszám volt észlelhető.

A fertőzött WT, *Asc*<sup>-/-</sup> és *Nlrp3*<sup>-/-</sup> egerek hólyagnyálkahártyájában 24 óra elteltével intenzív IL-1 $\beta$ -festés volt látható. Ezzel párhuzamosan magas IL-1 $\beta$  szint volt detektálható az *Asc*<sup>-/-</sup> és *Nlrp3*<sup>-/-</sup> egerek vizeletében is. A Western blot vizsgálat igazolta pro- és érett IL-1 $\beta$  jelenlétét is. Az eredmények arra utalnak, hogy az IL-1 $\beta$ , ASC és NLRP-3 fontos szerepet töltenek be az akut cystitis patogenezisében. Figyelemre méltó, hogy az NLRP-3 és az ASC elvesztése túlzott patológiát okozott, míg az IL-1 $\beta$  hiánya védelmező hatású volt, ami azt sugallja, hogy az IL-1 $\beta$  aktiválásra szükség van a gazdaszervezet válaszáának megindításához, és funkcionális inflammaszóma válaszra van szükség a súlyos betegség és a patológia elkerülése érdekében.

#### 4.2.2 Génexpresszió a fertőzött hólyagokban

Közel 2200 gén expressziójának kifejezett változása volt észlelhető a legsúlyosabb patológiával rendelkező egerek hólyagjában. A leginkább befolyásolt (FC>100) gének közé tartoztak: mátrix metalloproteináz 7 (*Mmp7*), a *Cxcl6*, és a *Cxcl3* (neutrofil és monocita kemoattraktánsok). A legjobban befolyásolt (erősített) kanonikus útvonalak (*Asc*<sup>-/-</sup> és *Nlrp3*<sup>-/-</sup> egerekben) a granulocita és leukocita diapedesist és jelátvitelt, az akut fázis válaszokat, beleértve az IL-6 és IL-1 $\beta$  jelátvitelt, az IL-1R expressziót és NF- $\kappa$ B jelátvitel és dendritikus sejt érést szabályozó útvonalak voltak. Ezek az útvonalak nem voltak szignifikánsan befolyásolva az *Il1b*<sup>-/-</sup> és C57BL/6WT egerekben, ami a közvetlen betegség asszociációra utal. Az IL-1 $\beta$  és az inflammaszóma hólyagpatológiában betöltött szerepének pontosabb megismerése céljából az inflammaszóma összetevőket, az inflammaszóma aktivátorokat és downstream effektorokat kódoló géneket választottuk ki további elemzésre (Qiagen lista: 84 kulcsfontosságú inflammaszóma gén). Jelentős különbség volt a súlyos akut gyulladásban szenvedő (*Asc*<sup>-/-</sup> és *Nlrp3*<sup>-/-</sup>) és a rezisztens egerek (C57BL/6WT vagy *Il1b*<sup>-/-</sup>) között. A súlyos

patológia a génexpresszió jelentős növekedésével társult ezekben a géncsaládokban. A *Cxcl1*, *Cxcl3*, *Il1b*, és *Il33* expressziója voltak leginkább regulálva (FC 5-200). Kiemelendő, hogy az inflammaszóma gének expressziója gyakorlatilag hiányzott az *Il1b*<sup>-/-</sup> egerekben, hangsúlyozva azt, hogy az IL-1 $\beta$ -ra szükség van a fertőzésre adott válasz kiváltásához.

#### 4.2.3 Az IL-1 $\beta$ kaszpáz-1 független aktiválódása/feldolgozása

Annak eldöntésére, hogy a pro-IL-1 $\beta$  hasítását az inflammaszóma végzi a kaszpáz-1 enzim által, hólyag epithelsejteket fertőztünk meg kaszpáz-1 inhibitor (Z-VAD) jelenlétében. A pro-IL-1 $\beta$  hasításának csak részleges csökkenése volt észlelhető (15-40% redukció a kontrollhoz képest), ezzel azt sugallva, hogy az IL-1 $\beta$  feldolgozásának nagyrésze kaszpáz független módon történik az akut cystitis okozó baktériumtörzsek fertőzése esetén.

#### 4.2.4 Az IL-1 $\beta$ feldolgozás nem ismert útja

A pro-IL-1 $\beta$  kaszpáz független aktiválásának azonosításához a súlyos patológiát mutató *Asc*<sup>-/-</sup> és *Nlrp3*<sup>-/-</sup> egerekben leginkább expresszált géneket választottuk ki. Az *Mmp7* volt az egyik leginkább aktiválódott gén ezen egerekben, és az *Mmp7* expressziója egyértelmű összefüggést mutatott az egerek patológiai pontszámával. Az *Il1b*<sup>-/-</sup> vagy C57BL/6WT egerekben az *Mmp7* nem mutatott fokozott expressziót. Az immunhisztológiai vizsgálatok során erős MMP-7 intenzitás növekedés volt látható az *Asc*<sup>-/-</sup> és *Nlrp3*<sup>-/-</sup> egerek húgyhólyag nyálkahártyájában. Annak igazolására, hogy az MMP-7 valójában hasítja a pro-IL-1 $\beta$ -t, GST jelölt rekombináns pro-IL-1 $\beta$  és tisztított MMP-7 inkubációját végeztünk, *in vitro*. A keletkezett fragmentumok Western blot vizsgálata történt érett IL-1 $\beta$  specifikus antitesttel. A kinetikai elemzés az IL-1 $\beta$  időfüggő hasítását mutatta a teljes hosszúságú fehérje fokozatos csökkentésével 10-től 60 percig. Annak igazolására, hogy a hasított IL-1 $\beta$  fragmentumok valóban biológiailag aktívak, a húgyhólyag hámsejteket stimuláltuk a reakciókeverékkel. A hasított termékek dóziszfüggő PGE2 választ váltottak ki, ezzel igazolva, hogy a keletkezett IL-1 $\beta$  fragmentek biológiailag aktívak. Az eredmények egy új, MMP-7-függő mechanizmust igazoltak, amely részt vesz a pro-IL-1 $\beta$  aktivációjában az *Asc*<sup>-/-</sup> és *Nlrp3*<sup>-/-</sup> egerekben.



### **4.3 A neuropeptid- és neuropeptid receptor (SP/NK1R) aktiváció a hólyagfertőzés során, *in vitro* és *in vivo***

#### **4.3.1 Az *E. coli* fertőzés okozta neuroepithelialis válasz, *in vitro***

CY-17 fertőzés fokozta a sejtekben az NK1R és SP aktivációját. Az NK1R és SP festődés intenzitásának növekedése volt látható a fertőzést (CY-17,  $10^4$  CFU/ml, 4 óra) követően mind az idegsejtekben, mind a hólyag epithelsejtekben. A CFT073 fertőzés hasonlóan a CY-17-hez az SP fokozott expresszióját eredményezte mind a két sejtípus esetén. Ezzel szemben az ABU törzs nem okozott fokozott SP vagy NK1R választ a sejtekben.

#### **4.3.2 Neuroepithelialis aktiváció a hólyagfertőzés során, *in vivo***

A fertőzést követően az egerek hólyagjában az NK1R és SP immunfestés intenzitás fokozódása volt megfigyelhető az immunhisztokémiai vizsgálat során ( $P = 0.004$  és  $P = 0.02$  - a nem fertőzött kontroll sejtekhez képest). NK1R festődés egyértelműen azonosítható volt a fertőzött hólyagnyálkahártya lamina propriaájában az idegi plexusok lefutásának megfelelően. A fokozott NK1R és SP expressziót a hólyag RNS qRT-PCR vizsgálata is megerősítette. Az egerek vizeletében szintén emelkedett volt az SP szintje 24 órával és 7 nappal a fertőzést követően is ( $P < 0.05$ ). A fertőzött kísérleti állatok viselkedésében is szignifikáns különbség volt megfigyelhető. Az eredmények igazolták, hogy az akut cystitis során a mucosa neuropeptid aktivációja is létrejön, és aktívan részt vesz a hólyaghurut patogenezisében.

#### **4.3.3 A neutrofilek és a makrofágok részvétele a neuropeptid termelésben**

A súlyosan gyulladt húgyhólyagba történő erős neutrofil beáramlás ellenére az NK1R és SP esetében is csak csekély kolokalizáció volt megfigyelhető a neutrofilekkel vagy makrofágokkal, arra utalva, hogy az ideg- és hámsejtek képezik az NK1R és SP fő forrását a gyulladt húgyhólyag nyálkahártyájában.

### **4.4 Az IL-1 receptor, IL-1 $\beta$ feldolgozás és az NK1R gátlás vizsgálata akut cystitis során, *in vivo***

#### **4.4.1 Az IL-1 $\beta$ receptor antagonistá és az MMP-7 inhibitor hatékonysága**

Az IL-1 $\beta$  receptor antagonistá (Anakinra) kezelése megakadályozta súlyos patológia kialakulását, gyakorlatilag megszüntetve a hólyag ödémáját és hyperaemiáját, így lényegesen

alacsonyabb patológiai pontszámot eredményezve a kezeletlen *Asc*<sup>-/-</sup> egerekhez képest ( $P < 0.001$ ). Ezzel összhangban a vizeletben észlelt neutrofilek száma is alacsonyabb volt a kezelt egyedekben. Az MMP-7 szerepének további igazolása céljából, az *Asc*<sup>-/-</sup> egereknél MMP inhibitor (Batimastat) kezelés történt, amely hasonlóan az Anakinrához a fertőzés során kialakuló patológia jelentős csökkenését eredményezte az egerekben ( $P=0.002$  – a kezeletlen egyedekhez képest). A baktériumok és neutrofilek számának és aggregációjának is dramatikus csökkenése volt észlelhető a kezelt *Asc*<sup>-/-</sup> egerekben.

#### **4.4.2 Az NK1R gátlás hatása a hólyag gyulladására**

Az SR140333 kezelés megszüntette a gyulladás során kialakuló patológiát, ezzel szignifikánsan alacsonyabb patológiai ( $P < 0.05$  a fertőzés előtti és utáni kezelésnél) és hisztológiai ( $P = 0.005$  a fertőzés előtti és  $P = 0.03$  a fertőzés utáni kezelésnél) pontszámot eredményezve. A vizeletben észlelt neutrofilszám szintén csökkent ( $P = 0.02$  a fertőzés előtti és  $P = 0.002$  a fertőzés utáni kezelésnél). Az SR140333 kezelés hatására az NK1R festés intenzitása alacsony volt a fertőzött hólyagok falában és ezzel megegyezően az NK1R expressziója is alacsony volt (qRT-PCR).

#### **4.5 Az IL-1 $\beta$ és a neuropeptidek humán relevanciája**

A cystitises betegek vizeletében jóval magasabb átlagos IL-1 $\beta$  koncentráció volt, mint az ABU csoportban (CY:264.5 pg/ml, ABU:1.5 pg/ml,  $P < 0.001$ ). Az MMP-7 szintje minden esetben meghaladta a detekciós limitet (0.15 ng/ml) a cystitises beteg vizeletében, ezzel 15.4 ng/ml átlagos koncentrációt eredményezve, ami szignifikánsan magasabb volt az ABU csoportban mért átlagos 4,3 ng/ml szinthez képest. Az SP szintek esetében is az akut cystitisben szenvedő betegeknél szignifikánsan magasabb átlagos koncentráció volt mint az ABU csoportban (CY: 161,1 pg/ml; ABU:69,7 pg/ml;  $P < 0.001$ ). Az eredmények igazolták, hogy akut cystitis esetén az IL- 1 $\beta$ , az MMP-7 és SP szintje megemelkedik, ezzel igazolva ezen molekulák fontosságát az akut hólyaghurut során.

## **5 MEGBESZÉLÉS**

Az eredmények alapján a cystitis egy IL-1 $\beta$  által mediált és az inflammaszóma diszregulációval összefüggésbe hozható hiper-inflammatorikus betegség. Ezenfelül a pro-IL-1 $\beta$  egy eddig nem ismert, a mátrix metalloproteináz-7 általi proteolitikus aktivációja igazolódott, mint a

nyálkahártya-gyulladás egyik új szereplője. Akut cystitisben a nyálkahártya immunválaszát a baktériumok idegsejtekre és az epithelsejtekre gyakorolt közvetlen hatása szabályozza a neuropeptidek (SP) és a neuropeptid receptorok (NK1R) közreműködésével. Az IL-1 RA, MMP vagy NK1R inhibitorral történő kezelés hatékonysága az akut cystitisre érzékeny egerekben igazolta az IL-1 $\beta$ , MMP-7 és NK1R / SP fontosságát a kialakuló gyulladás patogenezisében. Az akut cystitisben szenvedő betegek vizeletében emelkedett IL-1 $\beta$  szintek voltak, szemben az ABU csoportban mért alacsony szintekkel. Az MMP-7, SP hasonló mintát mutatott. Ezen eredmények elsőként szolgáltatnak információt az akut hólyaghurut molekuláris hátteréről, reprodukálják az akut cystitisben szenvedő fogékony betegek fenotípusát állatmodellben, és értékelik az IL-1 $\beta$ , MMP-7 és SP válasz humán relevanciáját is. Az eredmények tükrében, az IL-1 $\beta$  és az MMP-7 vagy az NK1R gátlása terápiás célpont lehet a jövőben az akut fertőzéssel kapcsolatos tünetek enyhítésére, akár helyettesítve az antibiotikumokat is, amelyek használata egyre nehezebb ebben a betegcsoportban is.

## 5.1 Az IL-1 $\beta$ válasz akut cystitis során

Az uropatogén cystitis törzsek gyors IL-1 $\beta$  választ váltottak ki a hólyag hámsejtjeiben, de a vese hámsejtben nem történt kimutatható IL-1 $\beta$  aktiváció. Az akut cystitis súlyosságát a bakteriális virulencia egyértelműen befolyásolta, mivel az akut cystitis törzsek jóval erősebb IL-1 $\beta$  aktivációt eredményeztek, mint az ABU törzsek. Ez az összehasonlítás különösen értékes volt, mivel a CY és az ABU törzsek ugyanabból a geo-epidemiológiai csoportból származtak. A túlzott IL-1 $\beta$  válasz lehet káros is, de az IL-1 $\beta$  válasz rendellenessége megfigyelhető egyes autoimmun és autoinflammatorikus betegségekben is. Ez a kettősség a jelen vizsgálatban is nyilvánvaló volt, ahol a kontrollált IL-1 $\beta$  válaszra szükség volt a betegség kontrollált lefolyásához, azonban a rendellenes IL-1 $\beta$  válasz esetén észlelt súlyos gyulladás azt sugallta, hogy az akut cystitis egy fertőzés indukálta hiper-inflammatorikus betegsége a húgyhólyagnak. Az *Il1b*<sup>-/-</sup> egerek esetén észlelt védett fenotípus és az IL-1R-gátló terápiás hatékonysága az IL-1 $\beta$ -t a hólyagpatológia kialakulásának fő effektoraként azonosította.

## 5.2 Az inflammaszóma funkciójának, az IL-1 $\beta$ érésének és az inflammaszóma alkotóelemeinek (ASC, NLRP-3) szerepe

A súlyos gyulladás kialakulása az *Asc*<sup>-/-</sup> and *Nlrp3*<sup>-/-</sup> egerekben arra utalt, hogy az ép inflammaszóma funkció szükséges a szöveti homeosztázis fenntartásához a gyulladt húgyhólyagban. Az *Asc*<sup>-/-</sup> és *Nlrp3*<sup>-/-</sup> egerek vizeletében mért magas aktív IL-1 $\beta$  szintek a pro-IL-1 $\beta$  feldolgozását és aktivációját igazolták ezen egyedek esetén is. A kaszpáz gátlás részleges eredménye arra utalt, hogy a pro-IL-1 $\beta$  hasításában egyéb mechanizmusok is részt vesznek. Ezen észlelések és a transzkripció elemzés eredményei az MMP-7 lehetséges szerepére hívták fel a figyelmet (*Mmp7* volt az egyik legerősebben aktivált gén), amely a pro-IL-1 $\beta$  hasításában vehet részt. Az *in vitro* körülmények között végzett vizsgálatok igazolták a pro-IL-1 $\beta$  MMP-7 általi hasítását, valamint a hasított fragmentek biológiailag aktív voltát.

Az akut cystitis törzsek által kiváltott húgyhólyag patológia kialakulásának mechanizmusa különbözik az akut pyelonephritis esetén zajló folyamatoktól (fimbriák által közvetített TLR4 jelátvitel aktiválás). Ezt az eltérést a transzkripció vizsgálatok eredményei is alátámasztották, az akut cystitis törzsek általi MyD88-függő *Il1b* és *Tnf* expresszió potenciálisan magyarázza az IL-1 $\beta$  és IL-1 $\beta$ -függő gének expressziójának növekedését.

## 5.3 A neuropeptid- és neuropeptid receptor (SP/NK1R) aktiváció a hólyagfertőzés során

A mucosa epithelsejtjei fontos szerepet töltenek be az ideg- és immunrendszer szabályozásában is, és e rendszerek között végbemenő több irányú interakciók ismertek számos autoimmun és gyulladásos betegség esetén. A vizsgálat eredményei igazolták, hogy az akut cystitis patogenezisében a hólyagban lévő idegsejtek aktívan részt vesznek, a direkt bakteriális és közvetett epitheliális interakciók révén. A vizsgálat igazolta, hogy az epithelsejtek a fertőzés hatására neuropeptid receptorokat expresszálnak és neuropeptideket is ürítenek, ezzel azt igazolva, hogy az ideg- és epithelsejtek közös interakciója részt vesz a fertőzésben jelentkező patológia és fájdalom kialakulásában, továbbá a fertőzésre adott válasz során szecernált ligandok e két sejttypus koaktivációját okozva amplifikációs hurkot hoznak létre. Ezen eredmények arra utalnak, hogy a hólyagfertőzés esetén fellépő erős fájdalom a barrierként szolgáló epitheliális sejtek és a nyálkahártyában jelen lévő idegsejtek együttműködéseként alakul ki. A hólyag lamina propriájában jelenlévő egyéb sejtek is részt vehetnek ezen aktivációs

hurokban, mint pl. az eozinofil- vagy hízósejtek, melyeknek fontos szerepük van az akut cystitis patogenezisében. Ismert, hogy e sejttípusok SP szintézisre és szekrécióra is képesek interstitialis cystitisben vagy hólyagfájdalom szindrómában.

#### **5.4 AZ IL-1 receptor, IL-1 $\beta$ feldolgozás és a NK1R gátlás hatása akut cystitisben**

Az akut vagy a visszatérő hólyaghurut szociális, társadalmi és egészségügyre mért hatása nem elhanyagolható, elsősorban az érintett magas esetszám miatt, ennek ellenére molekuláris háttere kevésbé ismert. Új alternatív kezelési eljárások kidolgozására is szükség van, melyek helyettesíthetik az antibiotikum kezelést ebben a betegcsoportban. Az eredmények alapján az akut cystitis kialakulása megakadályozható az IL-1 $\beta$  receptor blokkolásával és az MMP-7 gátlásával is. Továbbá az NK1R gátlása egy érdekes alternatív lehetőséget jelenthet a cystitisben kialakuló patológia megelőzésére és a fájdalom kezelésére. Ezen eredmények alapján az NK1R antagonistá vagy a rövid távú immunterápia alkalmazása reális kezelési lehetőség lehet akut cystitisben vagy visszatérő húgyúti fertőzésekben, ahol az antibiotikumokkal szembeni növekvő rezisztencia szükségessé teszi új terápia alternatívák alkalmazását.

#### **5.5 Az IL-1 $\beta$ és a neuropeptidek humán relevanciája**

Az IL-1 $\beta$  az egyik első citokin, amely bakteriális cystitises beteg vizeletében megtalálható már a betegség kezdetén. Ezen megfigyelésekkel összhangban, a vizsgálatban az akut cystitisben szenvedő betegek vizeletében az IL-1 $\beta$  koncentrációja magasabb volt, mint az ABU- csoportban. Az MMP-7 szint szintén emelkedett volt, bizonyítva az IL-1 $\beta$  jelentőségét az akut hólyagfertőzésben. Az SP / NK1R jelentősége már korábban is ismert volt hólyagfájdalom vagy krónikus kismencedei fájdalom szindrómában, interstitialis cystitisben. E vizsgálatokkal összhangban az akut cystitises betegek vizeletében emelkedett SP szintek voltak az ABU csoporttal szemben. Ezen azonosított molekuláris markerek hasznosak lehetnek a diagnosztikai tesztek kifejlesztéséhez húgyúti fertőzésekben, valamint a genetikai variánsok előfordulása, mint például az ASC mutációk, a jövőben érdekes célpontjai lehetnek genetikai vizsgálatoknak visszatérő húgyúti fertőzések esetén.

## 6 ÖSSZEFOGLALÁS, KONKLÚZIÓ

1. Az akut cystitis egy IL-1 $\beta$  által mediált hiper-inflammatorikus betegsége a húgyhólyagnak. (I. Közlemény)
2. A betegség súlyosságát az IL-1 $\beta$  feldolgozásának mechanizmusa szabályozta, és ép inflammaszóma funkcióval rendelkező egerekben a mérsékelt, önkorlátozó hólyaggyulladás alakult ki. Az akut cystitis legsúlyosabb formája azon egerekben volt megfigyelhető, ahol az inflammaszóma ASC vagy NLRP-3 alkotóeleme hiányzott. Ezen egyedekben az IL-1 $\beta$  feldolgozás hiperaktív volt egy új, eddig nem ismert módon, amelynek hátterében a pro-IL-1  $\beta$  mátrix metalloproteináz-7 (MMP- 7) általi aktivációja állt. (I. Közlemény)
3. Az akut cystitis során fokozódik a neurokinin-1 receptor (NK1R) és a substance P (SP) expresszió mind mucosában lévő, mind a hólyag hámsejtjeiben is. A fertőzés során neuroepithelialis aktivációs hurok jön létre, amely részt vesz a nyálkahártya gyulladás és fájdalom kialakulásában akut cystitisben. (II. Közlemény)
4. Az IL-1 receptor antagonisták és az NK1R inhibitorok a súlyos patológiát mutató egerekben megakadályozták gyulladás kialakulását, ezáltal is igazolva e molekulák fontos szerepét a cystitis patogenezisében. Az MMP-gátló hasonló terápiás hatással bírt. (I.-II. Közlemény)
5. Az akut cystitisben szenvedő betegek vizeletében emelkedett IL-1 $\beta$ , SP és MMP-7 szintek voltak, igazolva e molekulák fontosságát és rámutatva esetleg jövőbeli használatukra, mint biomarkerek vagy terápiás célpontok. (I.-II. Közlemény)

## 7 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani mindenkinek, aki közreműködött e munka elkészítésében, kiváltképp szerzőtársaimnak.

Legfőképpen szeretnék köszönetet mondani FŐNÖKÖMNEK, Prof. Tenke Péternek, aki szüntelenül „hajtott előre”, folyamatos támogatást biztosítva a munkában és a tudományban. Minden lehetőséget biztosított az előrejutáshoz és fejlődéshez. Megtanított, hogy nincsen olyan, hogy nem megy, és főleg nem állunk meg. Nagyon köszönöm!

Különös köszönettel tartozom Prof. Catharina Svanborgnak, aki bevezetett a molekuláris biológia rejtelmeibe, az alap kutatás szépségeibe és átsegített a nehézségein. Nélküle e munka nem jöhetne volna létre. Köszönöm a sok segítséget és türelmet!

Dr. Björn Wult-nak, aki segítette tanácsaival munkámat, és lundi tartózkodásomat.

Köszönöm a lundi labor UTI és Hamlet csapatának a sok segítséget, hogy megtanítottak mindenre, ami szükséges a laborban és tudományban: Ines, Manoj, Gustav, Aftab, Anna, Daniel, James, Jenny, Nataliya, Yun ... - Thanks for ALL!

Külön köszönöm Gustav Rydström-nek és Deepak Raina-nak, hogy a Barátaim lettek! Mind munkában, mind szabadidőmben és kinti tartózkodásomban velem voltak! - Always welcome in Hungary! - PS: Gustav, my first son's name don't be HÁROM, but I have „3”.

Szeretném, megköszönni feleségemnek, hogy mindig támogatott és átnézte a „csűrűcsavarosan fogalmazott” irományaimat. Segített a munkában és mindenben... - Köszönöm ;)

Gyermekeimnek, akik „mindig nagy odaadással tűrték, ahogy a gépnél dolgozom”. Főleg Nagy Károly Apornak és a „Galaxis Őrzőinek”.

Szüleimnek, akik támogattak, hogy eljussak idáig.

Kollégáimnak, barátaimnak, akik elviselték a „türelmes természetem”, főleg, ha a „tudomány” súlya nyomasztotta vállamat. Köszönet dr. Köves Bélának, Bérczy Ildikónak és Szujer Katalinnak a tudományos munkában való tanácsokért, segítségért. Az Európai Urológus Társaságnak és a Magyar Urológus Társaságnak a kutatási ösztöndíjért.

UI: Ezek után lehet NAGY-A-POR. És ha lesz NAGY-JELES. Csak a lányom NAGY-ZOLNA.

### A tézis alapjául szolgáló teljes terjedelmű közlemények

- I. Ambite I\*, Puthia M\*, Nagy K\*, Cafaro C, Nadeem A, Butler DSC, Rydstrom G, Filenko N, Wullt B, Miethke T, Svanborg C; Molecular Basis of Acute Cystitis Reveals Susceptibility Genes and Immunotherapeutic Targets. PLOS PATHOGENS 12:10 Paper: e1005848 , 30 p. (2016) **IF: 6.608**

\*These authors contributed equally to this work.

- II. Butler DSC, Ambite I, Nagy K, Cafaro C, Ahmed A, Nadeem A, Filenko N, Tran TH, Andersson KE, Wullt B, Puthia M, Svanborg C; Neuroepithelial control of mucosal inflammation in acute cystitis. SCIENTIFIC REPORTS 8 Paper: 11015, 15 p. (2018) **IF: 4.122**

### A t  zis t  m  j  hoz kapcsol  d   k  zlem  nyek

#### *K  zlem  nyek*

- III. Magyar A, Alidjanov J, Pilatz A, Nagy K, Arthanareeswaran VKA, Poth S, Becsi A, Wagenlehner FME, Naber KG, Tenke P, K  ves B; The role of the Acute Cystitis Symptom Score questionnaire for research and antimicrobial stewardship. Validation of the Hungarian version. CENTRAL EUROPEAN JOURNAL OF UROLOGY 71:1 pp. 134-141. (2018)
- IV. Magyar A, Dob  k A, Bálint P, Arthanareeswaran VKA, Nagy K, P  th S, Bata A, Tenke P, K  ves B; H  gy  ti kórokozók spektrum  nak   s antibiotikum-rezisztenci  j  nak v  ltoz  sa oszt  lyunkon 2004   s 2017 között. MAGYAR UROLÓGIA 30:3 pp. 96-104. (2018)
- V. Magyar A, K  ves B, Nagy K, Dob  k A, Arthanareeswaran VKA, Balint P, Wagenlehner F, Tenke P; Spectrum and antibiotic resistance of uropathogens between 2004 and 2015 in a tertiary care hospital in Hungary. JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY 66:6 pp. 788-797. (2017) **IF: 2.122**
- VI. Ambite I, Nagy K, Godaly G, Puthia M, Wullt B, Svanborg C; Susceptibility to Urinary Tract Infection: Benefits and Hazards of the Antibacterial Host Response. MICROBIOLOGY SPECTRUM 4:3 Paper: UNSP UTI-0019-2014, 23 p.(2016)
- VII. Godaly G, Ambite I, Puthia M, Nadeem A, Ho J, Nagy K, Huang Y, Rydstrom G, Svanborg C; Urinary Tract Infection Molecular Mechanisms and Clinical Translation. PATHOGENS 5:1 e24, 9 p. (2016)



- VIII. Tenke P, Köves B, Nagy K, Hultgren SJ, Mendling W, Wullt B, Grabe M, Wagenlehner FME, Cek M, Pickard R Botto H, Naber KG, Bjerklund Johansen TE; Update on biofilm infections in the urinary tract. WORLD JOURNAL OF UROLOGY 30:1 pp. 51-57. (2012) **IF: 2.888**
- IX. Tenke P, Nagy K, Köves B, Németh Z, Howell AB, Botto H; A proanthocyanidin tartalmú tőzegáfonya szerepe a visszatérő húgyúti infekciók megelőzésében. MAGYAR UROLÓGIA 22:4 pp. 178-185. (2010)
- X. Tenke P, Ludwig E, Szalka A, Köves B, Nagy K; Uroszepszis - az Európai Urológus Társaság (EAU) irányelve alapján. MAGYAR UROLÓGIA 20:3 pp. 156-164. (2008)

#### *Könyvfejezetek*

- XI. Köves B, Tenke P, Nagy K; The Prevention and Treatment of Penile Prosthesis Infections. In: Nikibakhsh A - Clinical Management of Complicated Urinary Tract Infection. Rijeka, Horvátország: pp. 239-246. (2011)
- XII. Tenke P, Köves B, Nagy K, Uehara S, Kumon H, Hultgren SJ, Hung C, Mendling W; Biofilm and Urogenital Infections. In: Nikibakhsh A - Clinical Management of Complicated Urinary Tract Infection. Rijeka, Horvátország: pp. 145-158. (2011)
- XIII. Köves B, Tenke P, Nagy K; Infections associated with penile prostheses. In: Naber KG, Schaeffer AJ, Heyns ChF, Matsumoto T, Shoskes D, Bjerklund Johansen TE (edit.) Urogenital Infections : International Consultation on Urogenital Infections. Arnheim, Hollandia: European Association of Urology (EAU), pp. 554-561. (2010)
- XIV. Tenke P, Köves B, Nagy K; Urinary catheters and draigne systems: prevention and treatment of urinary tract infections. In: Naber KG, Schaeffer AJ, Heyns ChF, Matsumoto T, Shoskes D, Bjerklund Johansen TE (edit.) Urogenital Infections : International Consultation on Urogenital Infections. Arnheim, Hollandia: European Association of Urology (EAU), pp. 532-541. (2010)

#### *Folyóiratban megjelent előadás absztraktok*

- XV. Magyar A, Arthanareeswaran VKA, Soós L, Nagy K, Dobák A, Szilágyi IM, Justh N, Chandra AR, Köves B, Tenke P; Does micropattern (sharklet) on urinary catheter surface reduce urinary tract infections? Results from phase I randomized open label interventional trial. EUROPEAN UROLOGY SUPPLEMENTS 16:3 pp.146-148. (2017)

- XVI. Soós L, Magyar A, Adithyaa VK, Nagy K, Arthanareeswaran VKA, Köves B, Tenke P; Comparison of bacterial cultures from urine and catheter surface in patients with indwelling urinary catheter. EUROPEAN UROLOGY SUPPLEMENTS 16:11 e2952 (2017)
  
- XVII. Magyar A, Alidjanov J, Naber K, Wagenlehner FME, Köves B, Pilatz A, Adithyaa VK, Nagy K, Bécsi A, Tenke P; Translation and clinical validation of the Hungarian version of the Acute Cystitis Symptom Score (ACSS) questionnaire. EUROPEAN UROLOGY SUPPLEMENTS 15:11 e1442 (2016)
  
- XVIII. Soós L, Magyar A, Adithyaa VK, Köves B, Nagy K, Bálint P, Dobák A, Tenke P; Spectrum and susceptibility of uropathogens between 2004 and 2015 in a tertiary care hospital in Hungary. EUROPEAN UROLOGY SUPPLEMENTS 15:11 e1436 (2016)
  
- XIX. Nagy K, Köves B, Tenke P; The effectiveness of acoustic energy induced by uroshield device in the prevention of bacteriuria and the reduction of patients' complaints related to long-term indwelling urinary catheters. EUROPEAN UROLOGY SUPPLEMENTS 10: 2 pp. 163-164. (2011)
  
- XX. Nagy K, Szabó I, Köves B, Tenke P; Az urophatogén kórokozók spektrumának és érzékenységének követése az elmúlt hét év során osztályunkon. UROONKOLÓGIA 7:4 pp. 126-127. (2010)
  
- XXI. Tenke P, Köves B, Nagy K; Alacsony energiájú akusztikus hullámokat kibocsátó UroShield eszköz hatékonysága a katéterviselés mellett kialakuló bakteruria megelőzésében és a panaszok csökkentésében. MAGYAR UROLÓGIA 22:3 p. 42. (2010)
  
- XXII. Köves B, Tenke P, Balint P, Nagy K, Bode I, Hagymasi N; Spectrum and antibiotic susceptibility of uropathogens in our department between 2004 and 2007. EUROPEAN UROLOGY SUPPLEMENTS 8:4 p. 230. (2009)

## Coauthor's declaration

**Applicant:** Károly Nagy MD

**Corresponding author:** Catharina Svanborg, MD, PhD, Professor  
Department of Microbiology, Immunology and Glycobiology  
Institute of Laboratory Medicine  
Lund University

I hereby certify that I am familiar with the work of the applicant Mr/Ms

Regarding our joint results referred to in his / her thesis, were obtained

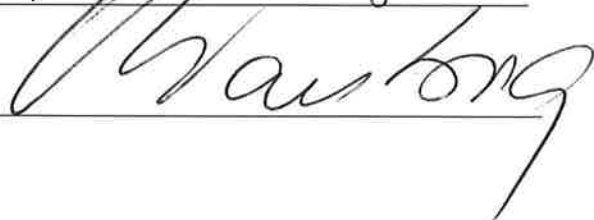
- as the result of joint contribution by the applicant and myself;
- the applicant's contribution was prominent in obtaining the results referred.
- the applicant has a shared first authorship in this article

Title:	Molecular Basis of Acute Cystitis Reveals Susceptibility Genes and Immunotherapeutic Targets
Authors:	Ambite I, Puthia M, Nagy K, Cafaro C, Nadeem A, Butler DS, Rydström G, Filenko NA, Wullt B, Miethke T, Svanborg C.
Journal	PLoS Pathog. 2016 Oct 12;12(10):e1005848. doi:10.1371/journal.ppat.1005848. eCollection 2016 Oct. PubMed PMID: 27732661; PubMed Central PMCID: PMC5061333.

Date:

27.11.2018

Signature:



## Coauthor's declaration

**Applicant:** Károly Nagy MD

**Corresponding author:** Catharina Svanborg, MD, PhD, Professor  
Department of Microbiology, Immunology and Glycobiology  
Institute of Laboratory Medicine  
Lund University

I hereby certify that I am familiar with the work of the applicant Mr/Ms

Regarding our joint results referred to in his / her thesis, were obtained

- as the result of joint contribution by the applicant and myself;
- the applicant's contribution was prominent in obtaining the results referred.

Title:	Neuroepithelial control of mucosal inflammation in acute cystitis
Authors:	Butler DSC, Ambite I, Nagy K, Cafaro C, Ahmed A, Nadeem A, Filenko N, Tran TH, Andersson KE, Wullt B, Puthia M, Svanborg C.
Journal	Sci Rep. 2018 Jul 20;8(1):11015. doi: 10.1038/s41598-018-28634-0. PubMed PMID: 30030504; PubMed Central PMCID: PMC6054610.

Date: 27.11.2018

Signature: 